

KRZYSZTOF PTAK<sup>1</sup>, MARIAN H. LEWANDOWSKI<sup>2</sup> i ROGER MONTEAU<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Department of Physiology, Medical School, Northwestern University  
303 East Chicago Av., Chicago, IL 60611-3008*

<sup>2</sup>*Zakład Fizjologii Zwierząt, Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński  
Ingardena 6, 30-060 Kraków*

<sup>3</sup>*Laboratoire de Neurobiologie des Fonctions Végétatives, ESA CNRS 6034, Faculté des Sciences  
St Jérôme, 13397 Marseille*

e-mail: LEW@ZUK.IZ.UJ.edu.pl

## EKSPRESJA GENÓW HOX W TRAKCIE RÓŻNICOWANIA I ROZWOJU PNIA MÓZGU ORAZ RDZENIA KRĘGOWEGO

W 1995 roku Królewska Akademia Nauk w Sztokholmie uhonorowała Nagrodą Nobla trzech uczonych: Edwarda Lewisa, Christiane Nüsslein-Volhard oraz Erica Wieschausa za badania nad genetycznym mechanizmem rozwoju muszki owocowej. Ich odkrycia stworzyły podwaliny genetyki rozwoju — nauki, której celem jest określenie działania genów sterujących formowaniem organizmu. Coraz więcej jest informacji na temat mechanizmu rozwoju i różnicowania ośrodkowego układu nerwowego zwierząt. Układ ten kontroluje pracę całego organizmu, dlatego też bardzo ważne jest jego prawidłowe uformowanie. W prezentowanym artykule przedstawiony jest mechanizm rozwoju pnia mózgu oraz rdzenia kręgowego, ze szczególnym uwzględnieniem formowania się motoneuronów, czyli neuronów ruchowych, unerwiających mięśnie szkieletowe, które kierują naszymi dowolnymi odruchami.

Rozwój nowego organizmu zwierzęcego rozpoczyna zapłodnienie, w czasie którego dwie komórki płciowe łączą się tworząc zygotę. Z powstałej zygoty, na drodze licznych procesów rozwojowych, utworzony zostaje nowy osobnik. Rozwój zarodkowy zwierząt rozpoczyna się bruzdkowaniem, podczas którego zapłodniona komórka jajowej dzieli się mitotycznie na wiele komórek zwanych blastomerami. W kolejnym etapie rozwoju zarodkowego — gastrulacji, tworzone są trzy listki zarodkowe: zewnętrzny — ektoderma, wewnętrzny — endoderma oraz środkowy — mezoderma. Na tym etapie rozwoju embrionalnego formowany jest więc zarodek trójwarstwowy. Utworzenie zarodka zbudowanego z trzech listków zarodkowych rozpoczyna organogenezę, czyli proces formowania tkanek i narządów. Jednym z pierwszych etapów tego procesu jest neurulacja — tworzenie cewki nerwowej.

### NEURULACJA

Mechanizm neurulacji jest podobny we wszystkich gromadach kręgowców, z wyjątkiem ryb.

Pierwotna ektoderma składa się z trzech obszarów, które dają początek:

- epidermie;
- cewce nerwowej, z której uformowany zostaje mózg i rdzeń kręgowy;
- grzebieniom nerwowym stanowiących materiał dla nerwów obwodowych i komórek glejowych.

Tworzenie cewki nerwowej jest wynikiem indukcji neuronalnej pomiędzy mezoderma

grzbietową a ektoderma. Proces ten rozpoczyna się organizacją płyty nerwowej. W tym okresie rozwoju, komórki ektodermalne produkują białko BMP4 (ang. bone morphogenic protein 4) (MEHLER i współaut. 1997) (Ryc. 1). Jego nieprzerwana synteza powoduje przekształcenie komórek ektodermy w epidermę, natomiast zahamowanie produkcji BMP4 powoduje utworzenie neuroblastu (WILSON i HEMMATI-BRIVANLOU 1997) (Ryc. 1A, B).

Proces neurulacji składa się z 4 etapów:

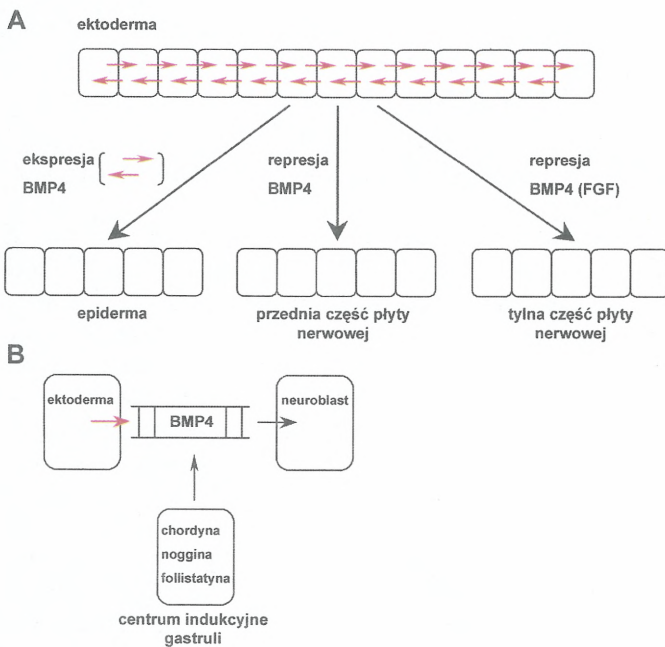
1. tworzenie płyty nerwowej;
2. modelowanie płyty nerwowej;

3. inwaginacja płyty i formowanie rynienki nerwowej;

4. zamknięcie rynienki i utworzenie cewki nerwowej.

W części przedniej płyty nerwowej, inaktywacja syntezy BMP4 jest wynikiem działania czynników będących induktorami neuronalnymi: follistatyny (YAMASHITA i współaut. 1995), nogginy (ZIMMERMAN i współaut. 1996) i chordyny (PICCOLO i współaut. 1996). Czynniki te syntetyzowane są w centrum indukcyjnym gastruli (warga grzbietowa prągeby u płazów oraz węzeł Hensena u owodniowców) i hamują syntezę BMP4 w komórkach neuroblastu umiejscowio-

W różnicowaniu osi przednio-tylnej cewki nerwowej owodniowców zaangażowane są geny homeotyczne: *lim-1* i *otx-2* (gen homologiczny do genu *orthodenticle* u muszki owocowej). Geny te ulegają ekspresji w komórkach węzła Hensena i odgrywają istotną rolę w rozwoju przedniej części cewki nerwowej (ANG i współaut. 1996). W kształtowaniu osi przednio-tylnej kręgowców dużą rolę odgrywa grupa genów *wnt* (nazwa tych genów pochodzi od połączenia nazwy genu *wingless* muszki owocowej i homologicznego genu kręgowców *integrated*). Ekspresja tych genów zachodzi wzdłuż głównej osi cewki nerwowej. Geny te kodują glikoproteiny regulujące



Ryc. 1. Mechanizm indukcji neuronalnej w zarodkach *Xenopus*.

A. W okresie organizacji płyty nerwowej komórki ektodermy syntetyzują białko BMP4 (czerwone strzałki). Zatrzymanie syntezy tego białka prowadzi do przekształcenia ektodermy w neuroblast, natomiast komórki w których synteza tego białka nie jest hamowana formują epidermę.

B. Produkcja przez wargę grzbietową prągeby (centrum indukcyjne gastruli) induktorów neuronalnych prowadzi do unieczynnienia syntezy BMP4 w przedniej części płyty nerwowej.

nych w przedniej części płyty nerwowej (LAMB i HARLAND 1995) (Ryc. 1B). W tylnej części płyty nerwowej, z której powstaje rdzeń kręgowy, represja białka BMP4 odbywa się za pośrednictwem fibroblastycznych czynników wzrostowych (LAMB i HARLAND 1995) (Ryc. 1A). W różnicowaniu tej części płyty nerwowej zaangażowany jest również kwas retinowy, którego działanie zależne jest od jego stężenia we wczesnych etapach gastrulacji (HILL i współaut. 1995). Działanie na gastrulę płatanu (z rodzaju *Xenopus*) kwasem retinowym o stężeniu mikromolowym hamuje rozwój przedniej i środkowej części mózgu (PAPALOPULU i współaut. 1991). Stężenie nanomolowe tego kwasu nie zaburza formowania płyty i cewki nerwowej, jednak w późniejszych etapach neurulacji zakłóca rozwój przedniej części mózgu (SIVE i współaut. 1990).

kształtowanie granicy między śródmózgowiem a tyłomózgowiem (porównaj z genami *gbx-2*) oraz mogą uczestniczyć w różnicowaniu rdzenia kręgowego (TANABE i JESSELL 1996).

Przed zamknięciem rynienki nerwowej w cewkę, część przednia cewki zróżnicowana jest na trzy pierwotne pęcherzyki mózgowe: przodomózgowie, śródmózgowie i tyłomózgowie. W trakcie następnych etapów rozwojowych przodomózgowie dzieli się na kresomózgowie, z którego uformowane zostają półkule mózgowe, oraz na międzymózgowie, z którego powstaje między innymi wzgórze, podwzgórze, siatkówka i nerw wzrokowy. Śródmózgowie redukuje się do poziomu wodociągu mózgu. Tyłomózgowie ulega podziałowi na tyłomózgowie wtórne, z którego rozwija się mózdzek i most Varolea oraz na rdzeniomózgowie dające początek rdzeniowi przedłużonemu.

ROZWÓJ PNIA MÓZGOWO-RDZENIOWEGO

W okresie embriogenezy ssaków tyłomózgowie jest strukturą metameryczną. Proces segmentacji tej części mózgu prowadzi do powstania 7 lub 8 rombomerów ułożonych wzdłuż głównej osi ciała (HOLLAND 1988, LUMSDEN i KEYNES 1989). Tyłomózgowie jest strukturą, w obrębie której różnicują się ośrodki nerwowe, między innymi oddychania, połykania, pracy serca oraz jądra nerwów czaszkowych: częściowo V i dalszych do XII (jądra między innymi: III, IV i częściowo V zlokalizowane są w śródmózgowiu). Postępuje również formowanie grzebieni nerwowych.

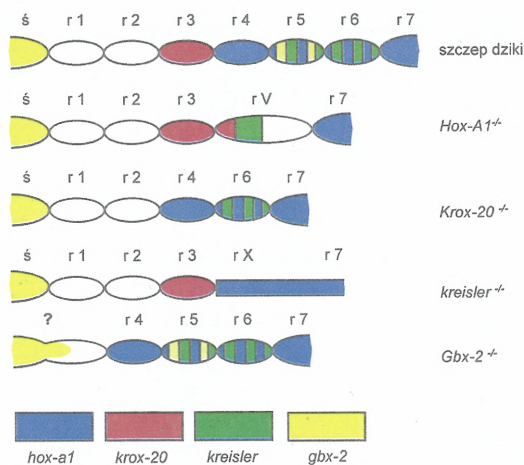
Wyniki badań ostatniego dziesięciolecia wykazują, że w komórkach rombomerów ekspresji ulegają geny tożsamości segmentów — geny homeotyczne *hox* (SCHNEIDER-MAUNOURY i współaut. 1998). Niezakłócona ekspresja tych genów warunkuje prawidłowe ułożenie rombomerów wzdłuż głównej osi ciała. Geny *hox* są konserwatywne w procesie ewolucji (KRUMLAUF 1992, KAPPEN i RUDDLE 1993) oraz homologiczne do grupy genów *hom-c* (kompleks Bithorax-Antennapedia) zidentyfikowanych u muszki owocowej (DUBOULE i DOOLLE 1989, GRAHAM i współaut. 1989). Geny *hom-c* zaangażowane są w różnicowanie segmentów ciała tego owada. Geny *hox* ułożone są w 4 kompleksach: *hox a*, *b*, *c*, *d* (SCOTT 1992, PRINCE i współaut. 1998) i znajdują się na różnych chromosomach: 2, 7, 12 i 17 u człowieka (ACAMPORA i współaut. 1989, BONCINELLI i współaut. 1989) oraz na 6, 11, 15 i 2 u myszy (DUBOULE i współaut. 1990, IZPISUA-BELMONTE i współaut. 1990).

Podobieństwa w sekwencji aminokwasowej homoprotein pozwalają na wyróżnienie 13 grup kodujących je genów *hox*, z których każda obejmuje od 2 do 4 genów ułożonych w tej samej kolejności w odpowiednich kompleksach *a*, *b*, *c* oraz *d* (SCOTT 1992). Geny *hox* charakteryzują się współliniowością pomiędzy miejscem ich ułożenia w kompleksie a zakresem ich ekspresji wzdłuż głównej osi ciała zarodka. Jeśli miejsce danego genu *hox* znajduje się blisko końca 3 określonego kompleksu, to jego ekspresja zachodzi w strukturach położonych bliżej części głowowej zarodka (PAPALOPULU i KINTNER 1993, DEKKER i współaut. 1993). LUFKIN (1996) sugeruje, iż ekspresja genów *hox* ułożonych na końcu 3 danego kompleksu zachodzi wcześniej niż genów zlokalizowanych na końcu 5.

Trzy pierwsze grupy genów każdego z kompleksów *hox* biorą udział w procesie rozwoju tyłomózgowia (MACONOCHE i współaut. 1996).

Jak do tej pory wyróżniono 4 geny odpowiedzialne za segmentację tej części mózgowia: *hox-a1*, *krox-20*, *kreisler*, *gbx-2* (SCHNEIDER-MAUNOURY i współaut. 1998) (Ryc. 2). Geny te kodują czynniki transkrypcyjne, czyli czynniki białkowe umożliwiające rozpoczęcie ekspresji innych genów.

Gen *hox-a1* odgrywa rolę w prawidłowym ułożeniu rombomerów tyłomózgowia wzdłuż głównej osi ciała oraz uczestniczy w jego segmentacji. Usunięcie tego genu na drodze rekombinacji homologicznej (nokaut) prowadzi do zaburzeń w rozwoju rombomeru 4 i 5, to znaczy do wypadnięcia rombomeru 4 oraz skrócenia (DOLLÉ i współaut. 1993) lub zaniku (CARPENTER i współaut. 1993) rombomeru 5. Pozostałości rombomerów 4 i 5 zlewają się z rombomerem 6, tworząc jeden rombomer V (CARPENTER i współaut. 1993, MARK i współaut. 1993) (Ryc. 2). Nokaut (wyłącznie) genu *hox-a1* opóźnia proces zamknięcia cewki nerwowej, wywołuje anomalie w rozwoju nerwów językowo-gardłowego i błędnego (MARK i współaut. 1993) oraz prowadzi do śmierci osesków w wyniku niedotlenienia krwi (LUFKIN i współaut. 1991).



Ryc. 2. Zestawienie ekspresji genów oraz ich usunięcia na drodze rekombinacji homologicznej w rombomerach tyłomózgowia.

Górny schemat reprezentuje miejsca ekspresji w poszczególnych rombomerach w niezmutowanym tyłomózgowiu. Dolne przedstawiają mutacje wybranych genów i ich wpływ na rozwijające się tyłomózgowie. Szczegółowy opis w tekście. r1-r7 — rombomery; ś — śródmózgowie.

Gen *krox-20* ulega ekspresji w obszarze tyłomózgowia, który odpowiada przyszłym rombomerom 3 i 5. Unieczynnienie tego genu pro-

wadzi do wypadnięcia tych rombomerów (SCHNEIDER-MAUNOURY i współaut. 1993, 1997). Produkt tego genu, czyli białko Krox-20 jest czynnikiem regulującym ekspresję *hox-a2* i *hox-b2* w obszarze rombomerów 3 i 5 (NONCHEV i współaut. 1996, VESQUE i współaut. 1996). Wydaje się również, że Krox-20 aktywuje ekspresję *hox-b3* w komórkach rombomeru 5 (Ryc. 2).

Gen *kreisler* ulega ekspresji w komórkach, które utworzą rombomery 5 i 6 (CORDES i BARSCH 1994). Mutacja tego genu prowadzi do wypadnięcia tych rombomerów oraz zaburza prawidłowe ułożenie rombomerów 4 i 7 (MOENS i współaut. 1996). *Kreisler* jest czynnikiem regulującym ekspresję *hox-b3* w obszarze rombomeru 5 (MANZANARES i współaut. 1997) (Ryc. 2).

W końcowych etapach gastrulacji oraz we wczesnej neurulacji, w obszarze grzbietowo-bocznym cewki nerwowej, ulega ekspresji gen *gbx-2*. Ekspresja tego genu odbywa się w tylnej części cewki, a przednia granica jego ekspresji umiej-

scowiona jest między tyłomózgowiem a śródmózgowiem (WASSARMAN i współaut. 1997). Sugeruje to, iż *gbx-2* zaangażowany jest w wyznaczenie granicy pomiędzy tymi dwoma pierwotnymi pęcherzykami mózgowymi (BUBNOFF VON i współaut. 1996). Nokaut tego genu powoduje wypadnięcie trzech pierwszych rombomerów i zastąpienie ich przez tylne odcinki śródmózgowia (WASSARMAN i współaut. 1997) (Ryc. 2).

W okresie metameryzacji tyłomózgowia wiele genów *hox* ulega ekspresji w tym obszarze mózgowia. Ekspresja tych genów, jej regulacja przez różne czynniki transkrypcyjne lub inne czynniki, na przykład kwas retinowy, a także wzajemne współdziałanie pomiędzy produktami tych genów, zapewnia prawidłową proliferację, segregację oraz ułożenie komórek w poszczególnych rombomerach. Prawidłowe współdziałanie między białkami, będącymi produktami genów odpowiedzialne jest za różnicowanie morfologiczne i anatomiczne rombomerów.

#### ROZWÓJ RDZENIA KRĘGOWEGO

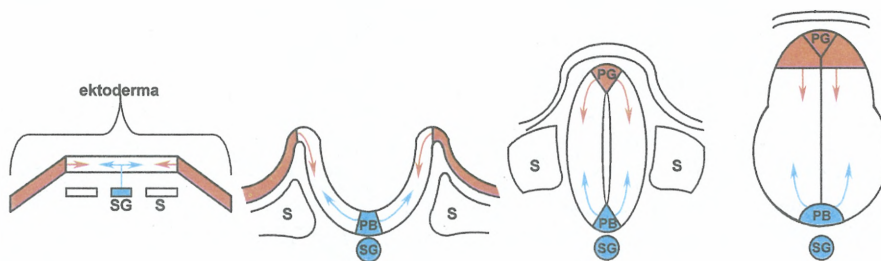
Komórki nerwowe tworzące rdzeń kręgowy wykazują mniejsze zróżnicowanie fenotypowe niż neurony w przednich odcinkach ośrodkowego układu nerwowego. Polaryzacja rdzenia kręgowego odbywa się, przede wszystkim, wzdłuż osi grzbietowo-brzuszej: motoneurony zlokalizowane są w brzusznej części rdzenia, natomiast interneurony czuciowe — w jej części grzbietowej.

W okresie rozwoju rdzenia kręgowego, w jego części brzusznej, różnicują się trzy typy komórek: a) komórki płyty brzusznej umiejscowione w pozycji środkowo-brzusznej, b) motoneurony zlokalizowane w położeniu brzuszno-bocznym, c) interneurony położone w linii grzbietowo-brzusznej. Komórki części grzbietowej rynienki nerwowej rozwijają się w kierunku: a) komórek płyty grzbietowej, b) interneuronów czuciowych, c) grzebieni nerwowych. Różnice morfologiczne między tymi komórkami warunkowane są przez sygnały wysyłane z różnych części rozwijającego się zarodka. Dla części brzusznej sygnały te pochodzą ze struny grzbietowej, natomiast dla części grzbietowej — z komórek epidermalnych (Ryc. 3).

Różnicowanie przyszłego rdzenia kręgowego zachodzi w wyniku wtórnej indukcji embrionalnej; komórki utworzonej cewki nerwowej, pod wpływem sygnałów pochodzących ze struny grzbietowej, dają początek komórkom płyty brzusznej, z których część przekształca się w neurony ruchowe (PLACZEK i współaut. 1990,

YAMADA i współaut. 1991). Ten typ wtórnej indukcji embrionalnej zachodzi pod wpływem białka Sonic Hedgehog (Shh), które jest produkowane przez komórki struny grzbietowej oraz przez komórki cewki nerwowej (ERICSON i współaut. 1996) (Ryc. 3). Białko Shh pochodzące ze struny grzbietowej hamuje ekspresję genów *pax3*, *pax7*, *msx1* i *msx2* w komórkach położonych w pozycji środkowo-brzusznej płyty nerwowej (ERICSON i współaut. 1996) (por. Ryc. 4). Natomiast w części grzbietowej cewki nerwowej geny te ulegają ekspresji w sposób ciągły. Geny *pax* kodują czynniki transkrypcyjne zbliżone do czynników parzystych występujących u muszki owocowej (KESSEL i GRUSS 1990). Ten typ czynników transkrypcyjnych charakteryzuje się obecnością jednej domeny złożonej z 128 aminokwasów, poprzez którą białko wiąże się z DNA. Geny *pax3* i *pax7* ulegają ekspresji w okresie formowania płyty nerwowej (okres indukcji neuronalnej w trakcie gastrulacji) (Ryc. 4). Zahamowanie ekspresji tych genów przez Shh jest konieczne do zróżnicowania brzusznych komórek nerwowych cewki (ERICSON i współaut. 1996, TREMBLAY i współaut. 1996). Gen *pax3* zaangażowany jest również w proces zamykania cewki nerwowej (GOULDING i współaut. 1993), po zakończeniu którego *pax3* i *pax7* ulegają ekspresji wyłącznie w jej części grzbietowej.

Białko Shh syntetyzowane przez komórki struny grzbietowej oraz cewki nerwowej bierze



Ryc. 3. Indukcja embrionalna rdzenia kręgowego.

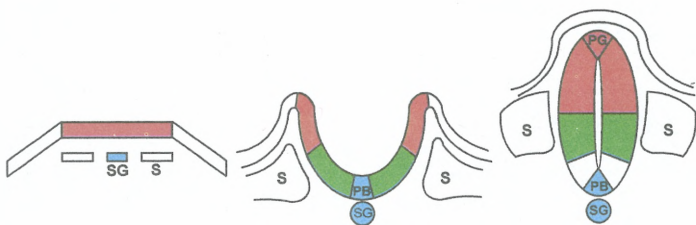
Część grzbietowa rdzenia kręgowego indukowana jest przez białka BMP (kolor czerwony), a część brzuszna — przez białko Shh (kolor niebieski). Podczas tworzenia i modelowania płyty nerwowej Shh syntetyzowane jest przez komórki mezodermalne struny grzbietowej (SG), a w okresie inwaginacji i tworzenia cewki nerwowej dodatkowo przez komórki płyty brzusznej (PB). BMP pochodzi początkowo z komórek ektodermalnych, a po zamknięciu cewki nerwowej dodatkowym źródłem tego białka są komórki płyty grzbietowej (PG) cewki nerwowej.

udział w różnicowaniu motoneuronów oraz interneuronów umiejscowionych w części brzusznej cewki (YAMADA i współaut. 1991, MCCONNELL 1995). Różnicowanie morfologiczne komórek nerwowych leżących po stronie brzusznej cewki nerwowej zależne jest od stężenia Shh. Zaha-mowanie syntezy Shh zaburza różnicowanie w kierunku motoneuronów i prowadzi do rozwoju interneuronów (ERICSON i współaut. 1997). Stę-żenie Shh regulowane jest przez produkt genu *pax6*, gdyż mutacja w tym genie prowadzi do zaburzeń rozwoju motoneuronów umiejscowio-nych w rdzeniu przedłużonym i kręgowym (ERICSON i współaut. 1997). Wydaje się, iż pro-dukt genu *pax6* jest konieczny do ekspresji *islet-2* (rodzina białek posiadających domenę LIM, która powiązana jest dwoma palcami cyn-kowymi) oraz *wnt-7b*. Geny te odgrywają ważną rolę w procesie dywersyfikacji motoneuronów (MCCONNELL 1995, ERICSON i współaut. 1997, OSUMI i współaut. 1997).

w kierunku rozwijających się mięśni (TSUCHIDA i współaut. 1994):

1. obszar środkowy (ang. median motor column, MMC) obejmujący motoneurony, których aksony skierowane są w stronę mięśni brzusz-nych;
2. obszar środkowo-boczny (ang. lateral motor column median, LMC<sub>M</sub>) zawierający moto-neurony unerwiające mięśnie kończyn;
3. obszar boczny (ang. lateral motor column lateral, LMC<sub>L</sub>), z którego motoneurony wysyłają włókna osiowe w kierunku mięśni grzbieto-wych.

Motoneurony te są miejscem ekspresji ge-nów *lim* i *islet*, których białka: Lim-1, Lim-3, Islet-1 i Islet-2 są czynnikami transkrypcyjnymi posiadającymi domenę LIM (TSUCHIDA i współ-aut. 1994, MCCONNELL 1995). Białka zawierają-ce domenę LIM, zaliczane do białek regulatoro-wych, zaangażowane są w procesie różnicowa-nia komórkowego (DAWID i współaut. 1995).



Ryc. 4. Ekspresja genów *pax* w okresie rozwoju rdzenia kręgowego kurczącego.

W komórkach tworzącej się płyty nerwowej ekspresji ulegają geny *pax 3* i *pax 7* (kolor czerwony). Ekspresja genów *pax 3* i *pax 7* jest hamowana w części środkowej rynienki ner-wowej podczas jej formowania i zamykania. W tym okresie również ekspresji ulegają geny *pax 6* (kolor zielony) w pozycji środkowo-bocz-nej rozwijającej się rynienki. SG — struna grzbietowa; S — somity; PG — płyta grzbieto-wa; PB — płyta brzuszna.

W rozwijającym się rdzeniu kręgowym, mo-toneurony zlokalizowane są wzdłuż dwóch pod-łużnych kolumn biegnących po obu jego stro-nach. Rozwijające się motoneurony klasyfikuje się na podstawie umiejscowienia ich ciała w kolumnach oraz projekcji ich włókien osiowych

Geny *islet-1*, *islet-2*, *lim-1* i *lim-3* ulegają ekspresji w różnych typach komórek płyty brzu-sznej dając początek odpowiednim typom mo-toneuronów (przedstawiony poniżej porządek genów odpowiada kolejności ich ekspresji w poszczególnych typach motoneuronów):

— *islet-1*, *islet-2* i *lim-1* ulegają ekspresji w obszarze środkowym każdej z kolumn rdzenia kręgowego.

— *islet-1*, *islet-2* - w obszarach środkowym i środkowo-bocznym,

— *lim-1* i *islet-1* - w obszarze bocznym (TSUCHIDA i współaut. 1994).

Nokaut genu *islet-1*, który ulega ekspresji we wszystkich typach motoneuronów, prowadzi do zaburzeń ich rozwoju (PFAFF i współaut. 1996).

Wiele genów *hox* ulega ekspresji na poziomie rozwijającego się rdzenia kręgowego i bierze udział w wyznaczeniu jego osi głównej (LUMSDEN i KRUMLAU 1996). Mogą one być również zaangażowane w proces różnicowania komórek nerwowych budujących rdzeń kręgowy. Unieczynienie pewnych genów *hox-b* w rozwijających się neuronach prowadzi do zróżnicowania ich w kierunku motoneuronów, natomiast nieprze-

rwana ekspresja tych genów determinuje komórki w stronę neuronów spoidłowych (GRAHAM i współaut. 1991). Geny *hox* mogą także brać udział w wyznaczeniu osi grzbietowo-brzuszej rdzenia kręgowego (KRUMLAU i współaut. 1993).

W różnicowanie części grzbietowej cewki nerwowej zaangażowane są cząsteczki sygnałowe BMP4 i BMP7. Białka te pobudzają ekspresję genów *pax* i *msx*, tych samych, których aktywność w części brzusznej hamowana jest przez Shh (LIEM i współaut. 1995). Po zamknięciu cewki nerwowej, białka BMP4, BMP7 i dorsalin1 syntetyzowane są w części środkowo-grzbietowej cewki (LIEM i współaut. 1995). Odpowiedzialne są one za zróżnicowanie morfologiczne interneuronów czuciowych w rogach grzbietowych rdzenia kręgowego (TANABE i JASSELL 1996) (Ryc. 1 i 3).

## THE EXPRESSION OF HOX GENES DURING DIFFERENTIATION AND DEVELOPMENT OF BRAIN STEM AND SPINAL CORD IN VERTEBRATES

### Summary

A great achievement of the past decade has been the introduction of genetics for studying ontogenesis, including the development of the nervous system. The process of formation of the neural tube at a stage of neurulation depends on protein BMP4 (bone morphogenetic protein 4). In turn, repression of this protein by agents that are neural inducers (follistatin, noggin, chordin) leads to development of the anterior portion of the neural plate. In the posterior part of the plate, repression of BMP4 results from the activity of fibroblast growth factors. In the phase of embryogenesis, the developing cerebrospinal trunk is a metameric structure. Rhombomeres, which build up the developing rhombencephalon are a site of expression of homeotic *hox* genes. These genes are homologous to a group of *hom-c* genes of *Drosophila melanogaster*. Thirteen groups of *hox* genes can be distinguished, each containing from 2 to 4 genes arranged in the same order in four complexes A, B, C and D. The first three groups of each complex of the *hox* genes take part in the process of development of the rhombencephalon. To date, 4 genes responsible for segmentation of this part of the brain have been distinguished: *hox-a1*, *krox-20*, *kreisler* and *gbx-2*. Mutation of these genes

leads to serious anomalies in the development of the rhombencephalon. Of crucial importance to the development of the spinal cord is polarization along the dorsoventral axis, as well as morphological differentiation of nerve cells between motoneurons and interneurons. Morphological differences between these cells are determined by signals sent from different parts of a developing embryo. In the process of differentiation of motoneurons is engaged the Sonic Hedgehog (Shh) protein, which is produced by cells of the dorsal cord and by cells of the neural tube. The Shh protein that originates in the dorsal cord inhibits the expression of *pax3*, *pax7*, *msx1* and *msx2* genes. Inhibition of the expression of these genes is necessary for differentiation of ventral cells of the neural tube. At the same time, neural tube cells synthesize the Shh protein which participates in the differentiation of motoneurons. Four groups of developing motoneurons can be distinguished. Their classification is based on the localization of their perikaryons and on the projection of their axial fibres. Motoneurons are the site of expression of *lim* and *islet* genes which guarantee regular differentiation of these nerve cells.

### LITERATURA

- ACAMPORA D., D'ESPOSITO M., FAIELLA A., PANNESE M., MIGLIACIO E., MORELLI F., STORNAIUOLO A., NIGRO V., SIMEONE A., BONCINELLI E., 1989. *The human HOX gene family*. Nucleic Acids Res. 17, 10385-10402.
- ANG S. L., JIN O., RHINN M., DAIGLE N., STEVENSON L., ROSSANT J., 1996. *A targeted mouse Otx2 mutation leads to severe defects in gastrulation and formation of axial mesoderm and to deletion of rostral brain*. Development 122, 243-252.
- BONCINELLI E., ACAMPORA D., PANNESE M., D'ESPOSITO M., SOMMA R., GAUDINO G., STORNAIUOLO A., CAFIERO M., FAIELLA A., SIMEONE A., 1989. *Organization of human class I homeobox genes*. Genome 31, 745-756.
- BUBNOFF A. VON, SCHMIDT J. E., KIMELMAN D., 1996. *The Xenopus laevis homeobox gene Xgbx-2 is an early marker of anteroposterior patterning in the ectoderm*. Mech. Dev. 54, 149-160.
- CARPENTER E. M., GODDARD J. M., CHISAKA O., MANLEY N. R., CAPECCHI M. R., 1993. *Loss of Hox-A1 (Hox-1.6) function results in the reorganization of the murine hindbrain*. Development 118, 1063-1075.
- CORDES S. P., BARSH G. S., 1994. *The mouse segmentation gene kr encodes a novel basic domain-leucine zipper transcription factor*. Cell 79, 1025-1034.
- DAWID I. B., TOYAMA R., TAIRA M., 1995. *LIM domain proteins*. C. R. Acad. Sci. III 318, 295-306.

- DEKKER E. J., PANNESSE M., HOUTZAGER E., BONCINELLI E., DURSTON A., 1993. *Colinearity in the Xenopus laevis Hox-2 complex*. Mech. Dev. 40, 3-12.
- DOLLE P., LUFKIN T., KRUMLAUF R., MARK M., DUBOULE D., CHAMBON P., 1993. *Local alterations of Krox-20 and Hox gene expression in the hindbrain suggest lack of rhombomeres 4 and 5 in homozygote null Hoxa-1 (Hox-1.6) mutant embryos*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7666-7670.
- DUBOULE D., DOLLE P., 1989. *The structural and functional organization of the murine HOX gene family resembles that of Drosophila homeotic genes*. EMBO J. 8, 1497-1505.
- DUBOULE D., BONCINELLI E., DE ROBERTIS, E., FEATHERSTONE M., LONAI P., OLIVIER G., RUDDLE F. H., 1990. *An update of mouse and human HOX gene nomenclature*. Genomics, 7, 458-459.
- ERICSON J., MORTON S., KAWAKAMI A., ROELINK H., JESSELL T. M., 1996. *Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity*. Cell 87, 661-673.
- ERICSON J., RESHBASS P., SCHEDL A., BRENNER-MORTON S., KAWAKAMI A., VAN HEYNINGEN V., JESSELL T. M., BRISCOE J., 1997. *Pax6 controls progenitor cell identity and neuronal fate in response to graded Shh signaling*. Cell 90, 169-180.
- GOULDING M., STERRER S., FLEMING J., BALLING R., NADEAU J., MOORE K. J., BROWN S. D., STEEL K. P., GRUSS P., 1993. *Analysis of the Pax-3 gene in the mouse mutant splotch*. Genomics 17, 355-363.
- GRAHAM A., PAPALOPULU N., KRAUMLAUF R., 1989. *The murine and Drosophila homeobox gene complexes have common features of organization and expression*. Cell 57, 367-378.
- GRAHAM A., MADEN M., KRUMLAUF R., 1991. *The murine Hox-2 genes display dynamic dorsoventral patterns of expression during central nervous system development*. Development 112, 255-264.
- HILL J., CLARKE J. D., VARGESSON N., JOWETT T., HOLDER N., 1995. *Exogenous retinoic acid causes specific alterations in the development of the midbrain and hindbrain of the zebrafish embryo including positional respecification of the Mauthner neuron*. Mech. Dev. 50, 3-16.
- HOLLAND P. W. H., 1988. *Homeobox genes and the vertebrate head*. Development 103, 17-24.
- IZPISUA-BELMONTE J. C., DOLLE P., RENUCCI A., ZAPPAVIGNA V., FALKENSTEIN H., DUBOULE D., 1990. *Primary structure and embryonic expression pattern of the mouse Hox-4.3 homeobox gene*. Development 110, 733-745.
- KAPPEN C., RUDDLE F. H., 1993. *Evolution of a regulatory gene family: HOM/HOX genes*. Curr. Opin. Genet. Dev. 3, 931-938.
- KESSEL M., GRUSS P., 1990. *Murine developmental control genes*. Science 249, 374-379.
- KRUMLAUF R., 1992. *Evolution of the vertebrate Hox homeobox genes*. Bioessays 14, 245-252.
- KRUMLAUF R., MARSHALL H., STUDER M., NONCHEV S., SHAM M. H., LUMSDEN A., 1993. *Hox homeobox genes and regionalisation of the nervous system*. J. Neurobiol. 24, 1328-1340.
- LAMB T. M., HARLAND R. M., 1995. *Fibroblast growth factor is a direct neural inducer, which combined with noggin generates anterior-posterior neural pattern*. Development 121, 3627-3636.
- LIEM K. F., TREMML G., ROELINK H., JESSELL T. M., 1995. *Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm*. Cell 82, 969-979.
- LUFKIN T., DIERICH A., LE MEUR M., MARK M., CHAMBON P., 1991. *Disruption of the Hox-1.6 homeobox gene results in defects in a region corresponding to its rostral domain of expression*. Cell 66, 1105-1119.
- LUFKIN T., 1996. *Transcriptional control of Hox genes in the vertebrate nervous system*. Curr. Opin. Genet. Dev. 6, 575-580.
- LUMSDEN A., KEYNES R., 1989. *Segmental pattern of neuronal development in the chicken hindbrain*. Nature 337, 424-428.
- LUMSDEN A., KRUMLAUF R., 1996. *Patterning the vertebrate neuraxis*. Science 274, 1109-1115.
- MACONOCHE M., NONCHEV S., MORRISON A., KRUMLAUF R., 1996. *Paralogous Hox genes: function and regulation*. Annu. Rev. Genet. 30, 529-556.
- MANZANARES M., CORDES S., KWAN C. T., SHAM M. H., BARSH G.S., KRUMLAUF R., 1997. *Segmental regulation of Hoxb-3 by kreisler*. Nature 387, 191-195.
- MARK M., LUFKIN T., DOLLE P., DIERICH A., LE MEUR M., CHAMBON P., 1993. *Roles of Hox genes: what we have learnt from gain of function and loss of function mutations in the mouse*. C.R. Acad. Sci. III 316, 995-1008.
- MCCONNELL S. K., 1995. *Strategies for the generation of neuronal diversity in the developing central nervous system*. J. Neurosci. 15, 6987-6998.
- MEHLER M. F., MABIE P. C., ZHANG D., KESSLER J. A., 1997. *Bone morphogenetic proteins in the nervous system*. Trends Neurosci. 20, 309-317.
- MOENS C. B., YAN Y. L., APPEL B., FORCE A. G., KIMMEL C. B., 1996. *Valentino: a zebrafish gene required for normal hindbrain segmentation*. Development 122, 3981-3990.
- NONCHEV S., MACONOCHE M., VESQUE C., APARICIO S., ARIZAMCNAUGHTON L., MANZANARES M., MARUTHAINAR K., KUROIWA A., BRENNER S., CHARNAY P., KRUMLAUF R., 1996. *The conserved role of Krox-20 in directing Hox gene expression during vertebrate hindbrain segmentation*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 9339-9345.
- OSUMI N., HIROTA A., OHUCHI H., NKAFUKU M., IIMURA T., KURATANI S., FUJIWARA M., NOJI S., ETO K., 1997. *Pax-6 is involved in the specification of hindbrain motor neuron subtype*. Development 124, 2961-2972.
- PAPALOPULU N., KINTNER C., 1993. *Xenopus Distal-less related homeobox genes are expressed in the developing forebrain and are induced by planar signals*. Development 117, 961-75.
- PAPALOPULU N., CLARKE J. D., BRADLEY L., WILKINSON D., KRUMLAUF R., HOLDER N., 1991. *Retinoic acid causes abnormal development and segmental patterning of the anterior hindbrain in Xenopus embryos*. Development 113, 1145-1158.
- PFUFF S. L., MENDELSON M., STEWART C. L., EDLUND T., JESSELL T. M., 1996. *Requirement for LIM homeobox gene Isl1 in motor neuron generation reveals a motor neuron-dependent step in interneuron differentiation*. Cell 84, 309-320.
- PICCOLO S., SASAI Y., LU B., DE ROBERTIS E. M., 1996. *Dorsoventral patterning in Xenopus: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4*. Cell 86, 589-598.
- PLACZEK M., TESSIER-LAVIGNE M., YAMADA T., JESSELL T., DODD, J., 1990. *Mesodermal control of neural cell identity: floor plate induction by the notochord*. Science 250, 985-988.
- PRINCE V. E., JOLY L., EKKER M., HO R. K., 1998. *Zebrafish hox genes: genomic organization and modified colinear expression patterns in the trunk*. Development 125, 407-420.
- SCHNEIDER-MAUNOURY S., TOPILKO P., SEITANDOU T., LEVI G., COHEN-TANNOUDJI, M., POURNIN, S., BABINET, C., CHARNAY P., 1993. *Disruption of Krox-20 results in alteration of rhombomeres 3 and 5 in the developing hindbrain*. Cell, 75, 1199-214;
- SCHNEIDER-MAUNOURY, S., SEITANIDOU, T., CHARNAY, P., LUMSDEN A., 1997. *Segmental and neuronal architecture of the hindbrain of Krox-20 mouse mutants*. Development 124, 1215-1226.

- SCHNEIDER-MAUNOURY S., GILARDI-HEBENSTREIT P., CHARNAY P., 1998. *How to build a vertebrate hindbrain. Lessons from genetics.* C.R. Acad. Sci. III 321, 819-834.
- SCOTT M. P., 1992. *Vertebrate homeobox gene nomenclature.* Cell 71, 551-553.
- SIVE H. L., DRAPER B. W., HARLAND R. M., WEINTRAUB H., 1990. *Identification of a retinoic acid-sensitive period during primary axis formation in Xenopus laevis.* Genes Dev. 4, 932-942.
- TANABE Y., JESSELL T. M., 1996. *Diversity and pattern in the developing spinal cord.* Science 274, 1115-1123.
- TREMBLAY P., PITUELLO F., GRUSS P., 1996. *Inhibition of floor plate differentiation by Pax3: evidence from ectopic expression in transgenic mice.* Development 122, 2555-2567.
- TSUCHIDA T., ENSINI M., MORTON S.B., BALDASSARE M., EDLUND T., JESSELL T. M., PFAFF S. L., 1994. *Topographic organization of embryonic motor neurons defined by expression of LIM homeobox genes.* Cell 79, 957-970.
- VESQUE C., MACONOCHE M., NONCHEV S., ARIZA-MCNAUGHTON L., KUROIWA A., CHARNAY P., KRUMLAUF R., 1996. *Hoxb-2 transcriptional activation in rhombomeres 3 and 5 requires an evolutionarily conserved cis-acting element in addition to the Krox-20 binding site.* EMBO J. 15, 5383-5396.
- WASSARMAN K. M., LEWANDOSKI M., CAMPBELL K., JOYNER A. L., RUBENSTEIN J. L., MARTINEZ S., MARTIN G. R., 1997. *Specification of the anterior hindbrain and establishment of a normal mid/hindbrain organizer is dependent on Gbx2 gene function.* Development 124, 2923-2934.
- WILSON P. A., HEMMATI-BRIVANLOU A., 1997. *Vertebrate neural induction: inducers, inhibitors, and a new synthesis.* Neuron 18, 699-710.
- YAMADA T., PLACZEK M., TANAKA H., DODD J., JESSELL T.M., 1991. *Control of cell pattern in the developing nervous system: polarizing activity of the floor plate and notochord.* Cell 64, 635-647.
- YAMASHITA H., TEN DIJKE P., HUYLEBROECK D., SAMPATH T. K., ANDRIES M., SMITH J. C., HELDIN C. H., MIYAZONO K., 1995. *Osteogenic protein-1 binds to activin type II receptors and induces certain activin-like effects.* J. Cell Biol. 130, 217-226.
- ZIMMERMAN L. B., DE JESUS-ESCOBAR J. M., HARLAND R. M., 1996. *The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4.* Cell 86, 599-606.